نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، ص. ۲۶۶-۲۶۳

Journal of Plant Protection
Vol. 28, No. 2, Summer 2014, P. 263-266

مقاله کوتاه پژوهشی

اولین گزارش از ردیابی سرولوژیکی و مولکولی ویروس موزائیک پیسک سبز خیار (CGMMV) در استان‌های خراسان رضوی و شمالی

زهره مرادی[1*]- بهروز جعفرپور [2]- محمدعلی سبک خیز[3]

تاریخ دریافت:۱۳۸۹/۶/۳۰
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۵/۱۷

چکیده

آلودگی‌های ویروسی یکی از عوامل محدود کننده تولید کدوییان در ایران است. ویروس موزائیک پیسک سبز خیار (CGMMV) یکی از ویروس‌های مهم آلوده کننده کدوییان است که سبب خسارت جدی و مهمی در مراحل اولیه رشد به این گیاهان می‌شود. به‌منظور ردیابی این ویروس طی سال‌های ۱۳۸۹- ۱۳۸۸ تعداد ۲۲۰ نمونه مشکوک به آلودگی از برگ‌های بوته‌های ارقام مختلف خیار، کدو، هندوانه، خربزه، طالبی، گرمک از مزارع مختلف کدوییان و گلخانه‌های خیار استان‌های خراسان رضوی و شمالی جمع‌آوری و تحت شرایط استاندارد به آزمایشگاه منتقل گردید. آلودگی ۴۷ نمونه به CGMMV با انجام آزمون DAS-ELISA به اثبات رسید. عصاره برخی از این نمونه‌ها به چند گونه گیاه محک مایه‌زنی شد و بر اساس ظهور علایم و بررسی مجدد با آزمون الایزا وجود آلودگی تایید گردید. RNA کل از نمونه‌های الایزا مثبت با استفاده از محلول (Plus-)RNX^{TM} استخراج شد و واکنش RT- PCR با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی منطبق بر ژن کد کننده پروتئین پوششی ویروس انجام شد. پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۷٪ باندی معادل ۴۲۰ bp مشاهده گردید. نتایج این تحقیق اولین گزارش از وجود آلودگی به ویروس موزائیک پیسک سبز خیار در مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی و شمالی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزائیک پیسک سبز خیار، DAS-ELISA، RT-PCR، استان‌های خراسان رضوی و شمالی

مقدمه

تاکنون بیش از ۴۱ ویروس و ۴ ویروئید شناسایی شده‌اند که به‌طور طبیعی یا آزمایشگاهی گونه‌های مختلف خانواده کدوییان را آلوده می‌سازند (۱۱). ویروس موزائیک پیسک سبز خیار (CGMMV) عامل یکی از بیماری‌های معمول خانواده کدوییان است. CGMMV متعلق به جنس Tobamovirus از خانواده Virgaviridae است. پیکره ویروس میله‌ای شکل خمش ناپذیر به قطر ۱۸ و طول ۳۲۰- ۳۰۰ نانومتر و ژنوم یک بخشی از نوع RNA تک‌لای مثبت به طول ۶۶۲۴ نوکلئوتید است (۹). CGMMV اولین بار توسط اینسورث (۱) در سال ۱۹۳۵ در انگلستان از روی خیار با نام ویروس شماره ۳ (Cucumber virus 3) گزارش شد. در ایران، ایزدپناه (۱۳۶۱) اولین بار این ویروس را در منطقه فارس گزارش نموده و در سال ۱۳۶۵ توسط قربانی از مزارع ورامین جدا شده است. این ویروس بسیار با ثبات و فاقد ناقل اختصاصی است اما به سهولت به روش مکانیکی انتقال می یابد. همچنین از طریق پوسته بذر و آلودگی خاکی نیز منتقل می‌شود (۵). دامنه میزبانی طبیعی این ویروس محدود به خانواده کدوییان است و سبب خسارت جدی در مراحل اولیه رشد در کدوییانی مثل خیار و هندوانه می‌شود (۳). آلودگی به CGMMV سبب پدیدار شدن موزائیک و لکه‌های سبز، زرد، یا سفید نه تنها روی برگها بلکه روی میوه هم می‌شود (۱) و سبب آسیب رساندن به کیفیت و کمیت میوه می‌شود و کاهش بازدهی توسط این بیماری تا ۵۰ درصد هم می‌تواند برسد (۵). CGMMV یک ویروس با گسترش جهانی است و در بسیاری از کشورها از جمله چین، کره، ژاپن، یونان، انگلستان، پاکستان و فرانسه مورد بررسی قرار گرفته است (۱، ۲، ۶، ۸، ۹ و ۱۰). از آنجایی‌که استان خراسان از جمله مناطق مهم کشت انواع مختلف گیاهان جالیزی در ایران است و از طرف دیگر کشت خیار گلخانه‌ای نیز به سرعت گسترش رو به افزایش است و با توجه به اهمیت بیماری‌های ویروسی در محصولات جالیزی و عدم اطلاع از وجود ویروس CGMMV در استان خراسان رضوی و شمالی، شناسایی این ویروس در این استانها از نظر سرولوژیکی و مولکولی

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: zohrehmoradi2008@yahoo.com)

ضرورت دارد.

مواد و روش‌ها

جهت ردیابی ویروس مذکور، از تیرماه ۱۳۸۸ تا خرداد ۱۳۸۹ از گلخانه‌های خیار و مزارع مختلف کدوییان شهرستان‌های مختلف استان‌های خراسان رضوی و شمالی نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها از برگ‌های بوته‌های ارقام مختلف خیار، کدو، هندوانه، خربزه، طالبی و گرمک با علایمی از قبیل موزائیک، پیسک شدید، موزائیک پیسکی شدید، لکه‌های سبز تیره و روشن، بدشکلی و تاولی برگ جمع‌آوری شد. جهت شناسایی این ویروس از آزمون ساندویچ دو طرفه الایزا (DAS-ELISA) و گیاهان محک استفاده گردید.

آزمون الایزا: آزمون دو طرفه الایزا (DAS-ELISA) با آنتی‌بادی‌های چند همسانه‌ای اختصاصی این ویروس (DSMZ-Germany) طبق روش کلارک و آدامز (۴) انجام شد. نتایج بر اساس تغییر رنگ در چاهک‌ها و با استفاده از دستگاه الایزا خوان در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

دامنه میزبانی: برای جداسازی بیولوژیکی ویروس از گیاه محک *Chenopodium amaranticolor* استفاده شد. پس از ظهور لکه‌های موضعی، لکه‌های مذکور جدا و در یک قطره بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۷ له و برای تکثیر، روی برگ‌های خیار و خربزه در مرحله دو برگی مایه‌زنی گردید. برای مطالعه دامنه میزبانی و مشاهده علایم ویروس عصاره نمونه‌های آلوده به نسبت ۱:۱۰ (W:V) در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۷ تهیه و با کمک پودر کربوراندوم به برگهای گیاهان محک شامل *Cucumis sativus*، *Nicotiana tabacum* cv. *samsun*. *Petunia hybrida* ،*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi-nc*،*C.* ،*Cucumis melo* ،*amaranticolor* ،*Datura stramonium Cucumis melo* var. *reticulatus* مایه‌زنی گردید. این گیاهان در گلخانه عاری از حشرات در دمای ۲۵-۲۰ °C نگهداری شدند.

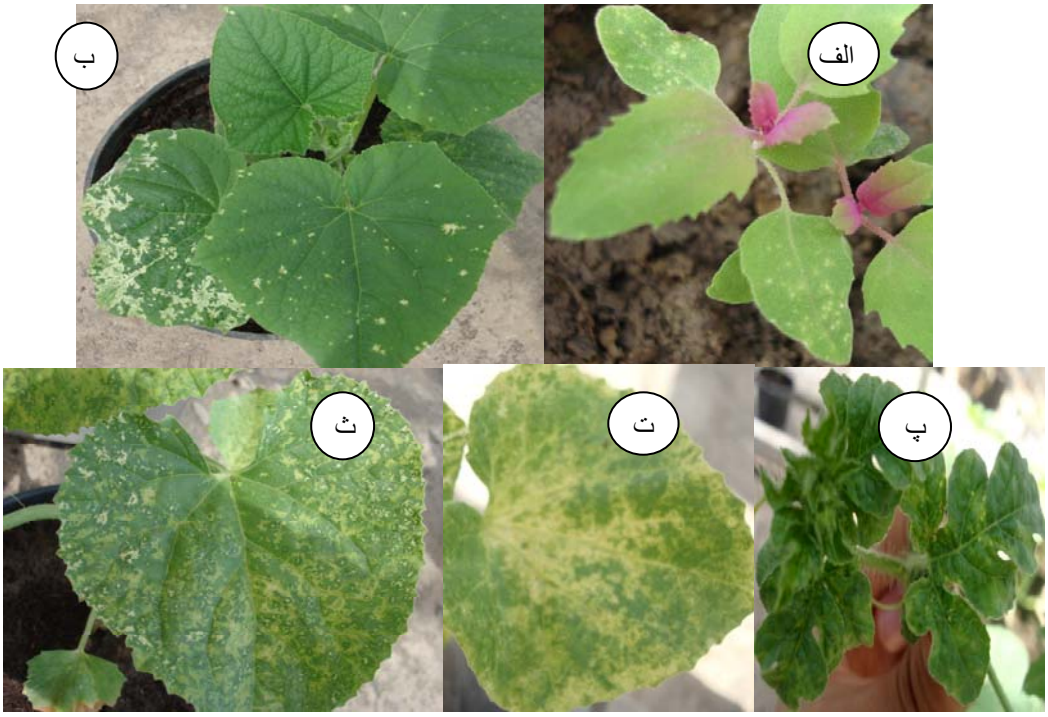
استخراج RNAی کل، سنتز cDNA و انجام واکنش PCR: استخراج آر.ان ای کل گیاه از نمونه‌هایی که آلودگی آنها در آزمون الایزا به اثبات رسیده بود با استفاده از محلول RNX^{TM}(Plus) (سیناژن ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. جهت انجام واکنش‌های RT-PCR از یک جفت آغازگر اختصاصی CGMMV شامل آغازگر معکوس (5′- AAAACGCGGCTTCAAATG -3′) و مستقیم (5′- TTATTGCGTTTAGTGCTTCTTATG -3′) (۷) به ترتیب واقع در ناحیه ۶۲۱۰-۶۱۹۳ و ۵۸۱۷-۵۷۹۴ ژنوم کامل نژاد CGMMV-W استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت AccuPower RT Premix (Bioneer Inc. Korea) انجام شد. بعد از ساخت cDNA برای تکثیر آن از کیت AccuPower PCR Premix (Bioneer Inc. Korea) استفاده گردید. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از نوع Touch down PCR عبارت از یک برنامه ۱۲ چرخه‌ای (کاهش درجه حرارت به اندازه یک درجه در هر سیکل) شامل دمای ۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه، ۹۴ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، ۶۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای شامل دمای ۹۴ به مدت ۵۰ ثانیه، ۵۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه بود (۷). سپس محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۷٪ در بافر TBE مورد بررسی قرار گرفت. پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید با دستگاه UV Transilluminator باندهای اسیدنوکلئیک مشاهده و توسط دستگاه Gel documentation از ژل عکس‌برداری شد.

نتایج و بحث

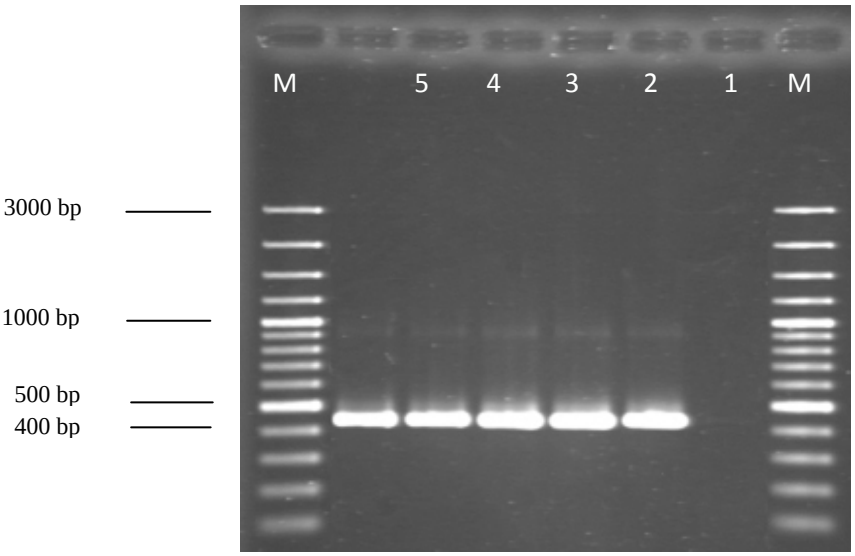
از ۲۲۰ نمونه جمع‌آوری شده، تعداد ۴۷ نمونه در آزمون DAS-ELISA آلوده به CGMMV بود. به جز گیاه کدو سایر گیاهان جالیزی در این آزمون مثبت ارزیابی شدند. علایم بیماری در بوته‌های آلوده به CGMMV در گونه‌های مختلف خانواده کدوییان متنوع بود. مهمترین علایمی که مشاهده گردید موزائیک ابلقی خفیف تا شدید و به‌صورت لکه‌های سبز تیره و روشن، پیسه‌ای و تاولی شدن برگها بود. در شرایط گلخانه، برگ‌های مایه‌زنی شده خیار، خربزه و هندوانه علایم آلودگی را بطور سیستمیک ظاهر ساختند و گیاهان محک *C. amaranticolor* ، *N. tabacum* لکه موضعی کلروزه نشان دادند. علایم روی خیار به صورت موزائیک ابلقی سیستمیک، و در طالبی و خربزه به صورت موزائیک ابلقی شدید به صورت لکه‌های سبز تیره و روشن، زردی و روشنی رگبرگ سیستمیک مشاهده شد. علایمی بر روی *Petunia hybrida, Datura stramonium* مشاهده نشد (شکل ۱).

آزمون RT-PCR: آغازگرهای اختصاصی CGMMV قادر به شناسایی این ویروس در عصاره گیاه آلوده بودند پس از الکتروفورز محصول PCR مربوط به نمونه‌های مثبت الایزا در ژل آگاروز ۱/۷ ٪ باندی در حدود ۴۲۰ bp مشاهده گردید (شکل ۲) بنابراین نتایج RT-PCR نیز تایید کننده نتایج الایزا بود.

بر اساس نتایج آزمونهای سرولوژیکی، مولکولی و گیاهان محک یکی دیگر از ویروس‌های آلوده کننده کدوییان CGMMV است که تاکنون از این استان‌ها گزارش نشده است و در سایر نقاط ایران نیز گزارشات محدودی از این ویروس صورت گرفته است.



شکل ۱- علایم روی تعدادی از گیاهان محک مایه‌زنی شده با جدایه‌های ویروس در گلخانه. الف- لکه موضعی کلروزه در سلمه تره (*C. amaranticolor*) ب- موزائیک ابلقی در خیار پ- پیسه‌ای شدن و تاولی برگ در هندوانه ت و ث- موزائیک ابلقی شدید به صورت لکه‌های سبز تیره و روشن، زردی و روشنی رگبرگ سیستمیک در طالبی و خربزه (به ترتیب)



شکل ۲- نتایج آزمون PCR در ژل آگاروز ۱/۷ ٪. M: نشانگر دی.ان.ای (۱۰۰bp). راهک ۱، شاهد مثبت. راهک‌های ۲ تا ۵ به ترتیب هندوانه، خربزه، خیار، طالبی آلوده به CGMMV. راهک ٦، کنترل منفی با آب مقطر.

اکثر علایم مشاهده شده در بوته های کدوییان با علایم گزارش شده از سایر مناطق جهان مطابقت داشت. اهمیت شناسایی CGMMV علاوه بر تاثیر آن در کاهش کیفیت و کمیت محصولات کدوییان می‌تواند به عنوان کانون آلودگی برای سایر محصولات کشاورزی عمل نماید. از آنجا که ویروس مذکور در خاک بسیار پایدار است و انتقال آن فقط به‌صورت مکانیکی است در نتیجه رعایت

بهداشت در مزرعه و گلخانه‌های خیار بسیار مناسب است. طبق بررسی‌های انجام گرفته آلودگی به CGMMV در گلخانه‌های خیار بیشتر از مزارع کدوییان است. در مزارع نیز اکثراً آلودگی به صورت هم‌زمان با سایر ویروس‌های آلوده کننده کدوییان مانند WMV, CMV, SqMV, ZYMV وجود دارد (اطلاعات نشان داده نشده است) و گاهی میزان آلودگی در برخی گلخانه‌ها بسیار بالا بود و حدود ۷۰ درصد بوته‌ها دارای علایم ویروسی بودند به‌طوری‌که کاشت محصول غیر اقتصادی به نظر می‌رسید. به کارگیری ارقام مقاوم مؤثرترین راه کنترل این بیماری ویروسی شناخته شده است که از نظر اقتصادی و زیست محیطی ارزشمند می‌باشد.

منابع

1- Ainsworth G.C. 1935. Mosaic disease of cucumber. Ann. Appl. Biol, 22:55-67.

2- Ali A., Natsuaki T., and Okuda S. 2004. Identification and Molecular Characterization of Virus Infecting Cucurbits in Pakistan. Journal of Phytopathol, 152: 677-682.

3- Antignus Y., Wang Y., Pearlsman M., Lachman O., Lavi N. and Gal-On A. 2001. Biological and molecular characterization of a new cucurbit-infecting tobamovirus. Phytopathology, 91: 565–571.

4- Clark M.F. and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.

5- Budzanivska I.G., Rudneva T.O., Shevchenko T.P., Boubriak I., and Polischuk V.P. 2007. Investigation of Ukrainian isolates of cucumber green mottle mosaic virus. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 40(5): 376-380.

6- Kim S., Lee J. and Yim K. 2003. Nucleotide Sequences of Two Korean Isolates of *Cucumber Green Mottle Mosaic Virus*. Molecular Cells, 16 (3): 407-412.

7- Lee S.K., Song W.Y. and Kim H.M. 2004. Detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Bottle Gourd Seeds by RT-PCR. Research in Plant Disease, 10(1):53-57.

8- Letschert B., Adam G., and Lesemann D. 2002. Detection and Differentiation of Serologically Cross-Reacting Tobamoviruses of Economical Importance by RT-PCR and RT-PCR RFLP. Journal of Virology Methods, 106 (1): 1-10.

9- Tan S.H., Nishiguchi M., Murata M. and Motoyoshi F. 2000. The genome structure of *kyuri green mottle mosaic tobamovirus* and its comparison with that of *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus*. Archives of Virology, 145: 1067–1079.

10- Varveri C., Vassilakos N. and Bem F. 2002. Characterization and Detection of *Cucumber Green Mottle Mosaic Virus* in Greece. Phytoparasitica, 30: 493–501.

11- Zitter T.A., Hopkins D.L. and Thomas C.E. 1996. Compendium of Cucurbit Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.